SUR LES RELATIONS ENTRE UN BASIDIOMYCÈTE DE ROND DE SORCIÈRE, *LEUCOPAXILLUS GIGANTEUS*, LA MICROFLORE DU SOL ET LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS.

Paul KAISER *

INA-PG
Microbiologie
78850 THIVERVAL-GRIGNON
FRANCE

* adresse actuelle : 12 bis rue de Porto-Riche 92190 MEUDON

ABSTRACT : *Leucopaxillus giganteus* developped as fairy rings in an acid grassland. According to the climatic conditions the spreading of the fairy ring ranged from 25 to 60 cm each year and occured at the end of the winter and the early spring. Fructification occured between september and october. Mycelium grew around the stolons and the roots of the grassand plants which were destroyed. The pH of the invaded soil raised due to a high ammonia level but the content of organic carbon and the C/N ratio was lowered. The *Leucopaxillus* mycelium enhanced the mineralization of organic carbon and nitrogen, the decomposed organic matter was partially humified. Concerning enzymatic activities of the invaded soil a decrease of the urease and an enhancement of the desaminases and pectinases activities was noticed. Supplementation in glucose or reducing sugars from root exsudates specifically stimulated the oxygen uptake of the invaded soil. In the latter the moulds were in great part eliminated but the number of the other soil microorganisms was only weakly affected. *In vitro* the *Leucopaxillus* mycelium inhibited the growth of bacteria and actinomycetes but not the moulds. Mycelium growth of *Leucopaxillus* on sterile and non sterile soil showed that the microflora exerted a strong inhibitory action against the *Leucopaxillus*. The inhibition diminished at low temperature. In pure culture *Leucopaxillus* mycelium developped well at +4° C whereas the major part of moulds and bacteria did not. It appeared that the *Leucopaxillus* needed two conditions for growth in soil : A biological void and an adapted nutrient. Low temperatures of the winter create the biological void. Root exsudates and bacterial polysaccharides of the roots could be the nutrient. *In vitro* the *Leucopaxillus* developped on bacterial mats but not on mould mats. It used well semi-synthetic media for growth. Best nitrogen sources were peptones, numerous simple sugars and polysaccharides could be used.

KEY WORDS : *Leucopaxillus giganteus*, soil biochemistry and microbiology, Phanerogams.

RÉSUMÉ : *Leucopaxillus giganteus* se développe en cercles dans une prairie acide où il avance de 20-60 cm chaque année, il croît autour des racines des phanérogames qui sont détruits et augmente la minéralisation du carbone et de l'azote organique. Les moisissures du sol sont, en grande partie, éléminées alors qu'*in vitro*, ce sont les bactéries et les actinomycètes qui sont inhibés. La microflore du sol exerce une action inhibitrice sur le développement du *Leucopaxillus* et celui-ci ne peut se propager qu'à la fin de l'hiver quand il y a un vide biologique. Le basidiomycète se multiplie bien au laboratoire sur des milieux peptonés semi-synthétiques et utilise une grande variété de glucides.

MOTS CLEFS : *Leucopaxillus giganteus*, biochimie et microbiologie du sol, Phanérogames.

INTRODUCTION

Il n'existe pas un mycologue qui n'ait observé, ici ou là, la forme annulaire qu'affectent quantité de mycéliums de champignons supérieurs, les uns dans les prés, visibles de tout temps à cause de l'herbe plus verte ou morte qui les dessine et, ceux des forêts, décelables au moment de la production de sporophores (Becker, 1990). Pour Fenwick (1976), les cercles peuvent être causés par 50 espèces de champignons. Très tôt, les mycologues se sont intéressés à la physiologie de ces anneaux (« ronds de sorcières »). Molliard (1910, 1925) mesurait l'accumulation d'ammoniaque dans la zone de croissance de *Marasmius oreades* (Bolt. : Fr.) Fr. et indiquait son rôle phytotoxique.

Hollande (1945) étudie la clitocybine, antibiotique excrété par *Leucopaxillus giganteus* (Leysser : Fr.) Singer (*Clitocybe maxima*) et constate que ce champignon détermine, dans les prairies alpines de 900 à 1400 mètres, la formation d'anneaux dont l'herbe est morte et peu putrescible. Il pense que le champignon, en se développant, tue l'herbe et doit élaborer un principe actif inhibant la multiplication des microbes nécessaires à la putréfaction des végétaux.

Couderchet (1967) reprend le travail sur un anneau dû à *Lepista personata* (Fr. : Fr.) W. Smith et constate une accumulation d'ammoniaque dans la zone dénudée, une élimination des moisissures et une inhibition des bactéries nitrifiantes.

Norstadt *et al.* (1973) notent la pauvreté de l'activité uréase d'un sol infesté de *Marasmius oreades*. Ces résultats prouvent que la multiplication d'un champignon supérieur provoque des changements physico-chimiques du sol, entraînant des variations importantes de la croissance herbacée et microbienne.

D'autre part, comme l'a montré Gramss (1981, 1985), les Basidiomycètes subissent, de la part du sol, un fort antagonisme.

Nous avons repris ces recherches sur deux anneaux dûs à *Leucopaxillus giganteus* situés dans une prairie acide de Jouy en Josas aux Metz (Yvelines) en analysant, d'une part l'effet du Basidiomycète sur l'évolution physico-chimique et microbiologique du sol infesté et, d'autre part, l'impact de la microflore autochtone sur sa croissance.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Dénombrement des groupes microbiens du sol : Pochon & Tardieux (1962).

— Analyses physico-chimiques :

pH : 5 g de sol + 5 g d'eau distillée ; mélange et mesure au ph-mètre.
C, N : Doseur automatique Hewlett-Packard
$NH4+$: méthode colorimètrique de Hoffmann & Teicher (1961).
NO3 — : méthode à l'acide chromotropique selon Sims & Jackson (1971).
Humidité : balance à humidité
Acides humiques : selon Pochon & Tardieux (1962).
HCN : papiers filtres imprégnés d'une solution contenant du carbonate de soude à 2,5 % et de l'acide picrique à 0,5 % (réactif de Guignard *in* Lebeau & Hawn (1963).

— Enzymes :

Uréase, Désaminases : méthode de Hoffmann & Teicher (1961).
Phosphatase : méthode de Hoffman (1967).
Pectinases : méthode de Kaiser & Monzon (1972).

— Respiration :

CO_2 *in situ* : méthode de Bachelier (1973).
Absorption de l'oxygène : Appareil de Warburg selon Umbreit *et al.* (1964).

— Antagonisme de la terre : technique de Pink (1961)

— Activité antagoniste : *Leucopaxillus giganteus* est cultivé sur boîtes de gélose malt-peptone (extrait de malt : 10 g/l ; bactopeptone Difco : 2 g/l). Des carrés de mycélium de 1 cm de côté sont découpés et placés sur des géloses asparagine-glucose (Pochon & Tardieux, 1962) préalablement ensemencées avec des souches pures ou des suspensions-dilutions de terre.

— Culture de *Leucopaxillus giganteus* :

Milieu semi synthétique : eau déminéralisée 1l ; phosphate monopotassique 1g ; sulfate de magnésium 0,5g ; chlorure de calcium 0,1g ; chlorure de sodium 0,1g ; solution d'oligoéléments 5ml ; solution de vitamines 0,5ml ; bactopeptone (Difco) 5g ; pH 6,0. Les glucides sont ajoutés à raison de 2g/l.

Solution d'oligoéléments (en g/l) : éthylènediaminetrétacétate sel disodique 1,7 ; sulfate de fer ferreux 1,0 ; sulfate de manganèse 0,3 ; acide borique 0,1 ; sulfate de zinc 0,05 ; sulfate de cuivre 0,05 ; molybdate d'ammonium 0,05 ; nitrate de cobalt 0,05 ; sulfate de cadmium 0,05

Solution de vitamines (en mg/100ml) : B12 2 ; thiamine 100 ; biotine 2 ; pantothénate de calcium 2.

— Milieu pour plantules (en mg/l) : nitrate de calcium 750 ; nitrate de potassium 450 ; sulfate de magnésium 260 ; phosphate monopotassique 136 ; solution d'oligoéléments (ci-dessus) 10ml.

– Préparation des sucres réducteurs provenant de la rhizosphère des plantes de prairies :

Les racines et le sol rhizosphérique attenant sont lavés dans un mélange éthanol-eau (30 : 70).

Le liquide de lavage est clarifié par centrifugation puis concentré. Il est alors passé sur résine cationique, puis sur résine anionique. Le liquide résiduel contenant les sucres est concentré à sec puis repris par 2ml d'eau distillée. Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Description de la prairie

Il s'agit d'une prairie à sol acide, (voir tableau 1 pour les données physico-chimiques) régulièrement tondue et comportant de nombreux types de plantes herbacées.



Fig. 1 — « Rond de sorcière » à *Leucopaxillus giganteus* dans une prairie acide de Jouy en Josas (78) au mois de septembre.

Nous y avons déterminé : *Festuca rubra, Holcus lanatus, Agrostis vulgaris* et *A. stolonifera, Anthoxanthum odoratum* pour les Graminées ; *Lotus corniculatus, Orobus tuberosus, Trifolium spp.* pour les Légumineuses ; *Hieracium pilosella, Achillea millefolium, Centaurea jacea, Chrysanthemum segetum, Picris hieracioides* pour les Composées ; *Plantago lanceolata, Carex glauca, Luzula campestris, Calluna vulgaris, Brunella vulgaris* pour ne nommer que les principales espèces d'autres familles.

Croissance *in situ* de *Leucopaxillus giganteus*

Dans le sol, le nouveau mycélium apparaît début mars, à la fin de l'hiver. Soit il est déjà visible macroscopiquement au niveau des stolons et des radicelles, soit le sol autour des racines se décolore, ce qui annonce son apparition massive. A cette époque, les plantes ne sont pas encore détruites. Le mycélium croît à 5-10 cm de la zone de développement de l'année précédente, laissant intacte une bande de prairie entre l'ancienne et la nouvelle zone. Nous n'avons pu trouver de mycélium reliant ces deux zones. Au cours du mois d'avril, le dépérissement des plantes de prairies envahies par le mycélium se manifeste sous forme de plaques jaunes, irrégulières et discontinues, disposées en une ligne presque droite ou un léger arc de cercle dont il est difficile d'évaluer le diamètre. Les plaques de pelouse détruite ont une largeur de 15 à 30 cm, parfois 50 cm lorsque le printemps est froid et humide et une longueur comprise entre 15 et 100 cm (figure l).



Fig. 2 – Profil du terrain au niveau de la couronne mycélienne en avril. A gauche, terre témoin : à droite, terre envahie par le mycélium du *Leucopaxillus giganteus*. Les stolons et radicelles des plantes sont enrobés de mycélium, la terre est décolorée.

En mai, les plantes envahies meurent et on remarque que le mycélium a poussé dans la zone des stolons et des radicelles sur quelques cms de profondeur (figure 2).

La terre envahie est décolorée par rapport à la terre non colonisée. Les stolons et racines des plantes sont complètement pourris, l'écorce est digérée, brune ; il ne subsiste qu'un cylindre central. Stolons et racines ont été pratiquement asphyxiés par l'important développement du mycélium qui les recouvre d'un dense feutrage blanc. C'est seulement plus tard, dans le courant du printemps, que le mycélium colonise les couches profondes (15 cm) du sol. La production de sporophores a lieu en septembre ou octobre. Les sporophores se situent alors à la périphérie des zones dénudées (figure 1) ; l'année suivante, elles seront recolonisées ; d'abord, par les plantes traçantes en surface : *Hieracium pilosella, Achillea millefolium* puis, progressivement, par des plantes à racines plus profondes. Le mycélium disparaît petit à petit des zones qu'il a colonisées et la végétation devient luxuriante.

Notre champignon fait chaque année une avancée centrifuge comprise entre 25 et 60 cm. Couderchet (1967) note une avancée moyenne annuelle de 50 cm en 12 ans avec *Lepista personata* mais la distance entre la 11e et 12e année est de 130 cm. Pour *Agaricus arvensis* J. C. Sch. : Fr., Edwards (1984) donne une moyenne de 42 à 49 cm par an. Ces trois espèces présentent une progression comparable et irrégulière d'une année à l'autre. Dans le cas de *Lepista personata*, Couderchet (1967) a nettement observé la prolifération cen-

	Leucopaxillus		Témoin	
	72	73	72	73
pH	5,1	5,0	4,5	4,4
C%	4,2	4,8	5,2	5,5
N%	0,15	0,45	0,08	0,33
C/N	28	10,6	65	16,6
ac. humiques g/Kg	10,5	-	7,8	-
N-NO_3 mg/100g	1,6	-	0,5	-
N-NH_4 mg/100g	42	30	1,4	4

Tableau I — Analyses physico-chimiques de la terre à *Leucopaxillus giganteus* et de la terre témoin en novembre 1972 et 1973.

trifuge du mycélium à la surface de la terre, reliant ainsi l'ancien cercle au nouveau. Nous n'avons jamais pu relever un tel phénomène : avec *Leucopaxillus*, aucun mycélium n'apparaît entre l'ancien et le nouveau cercle, que ce soit en profondeur ou en surface. Il est donc possible que ce champignon progresse grâce à ses spores. Toohey (1983), qui a observé 31 espèces de champignons de ronds de sorcière, pense que les spores sont responsables de la formation de nouvelles colonies. Cependant, une fois en janvier, nous avons décelé, à un endroit situé en bordure de l'ancien cercle, un développement de mycélium juste au niveau des stolons et des racines. Shantz et Piemeisel (1917) ont reconnu trois types d'anneaux selon leur action sur les Phanérogames. Le type 1, auquel appartient *Leucopaxillus*, comprend les mycéliums tuant ou endommageant sérieusement la végétation. *Leucopaxillus* a une affinité particulière pour les racines et les stolons qu'il colonise en premier. On peut sûrement le classer comme un pathogène des plantes de prairies. Gramss (1981) constate la dépendance de quelques Basidiomycètes vis-à-vis des racines des plantes cultivées et Poppe (1970/1971) (*in* Gramss, 1981) suggère que les racines vivantes des végétaux de prairie constituent une niche écologique pour le développement du mycélium des espèces d'*Agaricus*. Smith (1980) considère *Marasmius oreades* comme un parasite des racines.

Analyse physico-chimique de la terre des [redacted]

La zone externe (T) non envahie [redacted] été comparée à l'anneau envahi par le mycélium de *Leucopaxillus giganteus* (Lg) (analyses effectuées en novembre, tableau 1).

Nous mesurons dans la zone Lg une élévation du pH, dûe à une forte augmentation du taux d'azote ammoniacal. Aussi, le taux d'azote total dans Lg est-il plus élevé et le rapport C/N plus bas. Dans la zone à mycélium, il y a un peu moins de carbone organique mais davantage d'acides humiques. La minéralisation accentuée du carbone et de l'azote dans la zone à Lg va de pair avec une humification accentuée de la matière organique décomposée. Grunda (1976) a noté, pour d'autres Basidiomycètes, une élévation du taux des acides humiques. Ces résultats démontrent aussi que la décoloration de la terre par *Leucopaxillus* n'est pas le résultat d'une élimination des acides humiques. Elle dépendrait de l'excrétion d'acides organiques par *Leucopaxillus*. Nous avons vérifié que l'acide citrique décolore les acides humiques et que *Leucopaxillus* excrète des acide

	LG	T
Uréase (μgN-NH_4/g terre/heure)	33	77
désaminase (μgN-NH4/g terre/heure)		
Aspartate	0	0,04
Proline	2,1	0,4
Glycine	0,4	1,2
Glutamate	1,6	0,3
Leucine	1,9	0,4
Alanine	3,1	1
Arginine	2,6	1
Ornithine	1,7	0,5
Phosphatase acide (μg phénol/g terre/heure)	30	28
Pectinelyase (μg sucres réducteurs/g/heure)		
novembre	52	76
mai	120	82

Tableau 2 — Activité enzymatique des sols à *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et témoin (T) en novembre 1972.

organiques dans les milieux de culture au laboratoire : les milieux sont fortement acidifiés après la culture. Plusieurs auteurs dont Edwards (1984) et Couderchet (1967) mentionnent une décoloration de la terre envahie par le mycélium des Basidiomycètes. Dès 1910, Molliard relate une forte augmentation de l'ammoniaque dans les zones à mycélium de *Marasmius*, fait confirmé par Couderchet (1967) pour le *Lepista*. Cet auteur note aussi une augmentation de l'azote nitrique, ce que nous avons également observé. La diminution de la matière organique a été établie par Edwards (1984) sur des anneaux à *Agaricus* et confirme nos données. Grunda (1976), en comparant le sol témoin avec des sols envahis par trois types de Basidiomycètes, constate un abaissement du pH et du taux de calcium, une élévation du taux de N, P, K solubles alors que Fisher (1977) montre une diminution de N et P extractibles dans les sols où *Marasmius oreades* est passé. On peut donc conclure que le développement massif des mycéliums de Basidomycètes stimule fortement la minéralisation du carbone et de l'azote organiques du sol. Dans notre cas, une partie de la matière organique décomposée est humifiée.

Nous avons dosé l'activité de quelques enzymes (tableau 2). La terre à Lg contient moins d'uréase, ce qu'ont déjà constaté Norstadt *et al.* (1973) pour les anneaux à *Marasmius oreades*. L'urée ne semble pas constituer un bon substrat azoté pour ces champignons. Par contre, la terrre à Lg est plus riche en désaminases diverses, excepté pour la glycine-désaminase. Les acides aminés constituent donc de bonnes sources d'azote pour Lg et sont facilement minéralisés, d'où le taux élevé en ammoniaque retrouvé dans les anneaux.

Les enzymes pectinolytiques (pectinelyase) ainsi que la phosphatase acide reflètent l'activité biologique globale (Kaiser & Monzon de Asconegui, 1972 ; Domsch *et al.*, 1979). Elles ont une activité sensiblement égale pour les terres à Lg et le témoin. On remarque cependant une activité plus forte pour Lg en mai et moindre en novembre. Nous avons mesuré la respiration des deux terres au moyen de deux méthodes : le dégagement de gaz carbonique et l'absorption de l'oxygène. Dans l'ensemble, le taux de CO2 dégagé s'élève pendant l'été et diminue au fur et à mesure que la saison se refroidit, puis le dégagement reprend vers le printemps. En début d'été, la respiration est semblable dans la

DATE	Lg	T
18 juillet	635	616
20 septembre	469	156
9 novembre	127	137
13 mars	-	392

Tableau 3 — Dégagement de gaz carbonique en mg de C-CO_2/m^2/heure dans les anneaux de *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et dans les terres témoin (T) en 1973 et 1974.

terre à *Leucopaxillus* et la terre témoin mais, à la fin de la saison, le dégagement devient trois fois plus intense dans l'anneau à *Leucopaxillus* (tableau 3). Edwards (1984) décrit un phénomène similaire pour *Agaricus arvensis*. Ces mesures indiquent que la minéralisation du carbone organique est plus intense dans les anneaux à *Leucopaxillus*, ce qui ressortait déjà au vu des valeurs de carbone organique mesurées dans ces terres (voir plus haut). L'absorption de l'oxygène ne va pas dans le même sens que celui du dégagement de CO_2 mais les dosages ont été réalisés à une époque différente. Dans l'ensemble, la terre à *Leucopaxillus* absorbe beaucoup moins d'oxygène que la terre témoin (tableau 4). Avec l'addition de glucose, l'absorption d'oxygène se trouve fortement stimulée pour la terre à *Leucopaxillus* et, dans des proportions moindres, pour la terre témoin : par exemple, en novembre où l'absorption est particulièrement faible, l'addition de glucose l'augmente de 10 fois dans le cas de *Leucopaxillus* et seulement de 1,4 fois avec le témoin. En juin, l'augmentation est de 4,5 fois pour *Leucopaxillus* et de 1,8 avec pour le témoin. Les sucres réducteurs extraits des exsudats de racines de prairie ont un effet identique. On peut donc penser que, par rapport à la terre témoin, la terre à *Leucopaxillus* contient une plus forte biomasse, celle-ci souffrant d'un manque de glucides aisément assimilables, surtout à la fin de l'automne. Ce fait a été confirmé par des analyses radio-respirométriques effectuées par le professeur J. Mayaudon (Communication personnelle). Ce dernier a mélangé aux deux sols prélevés en septembre du glucose U14C et 114C. L'activité du sol à *Leucopaxillus* n'est que de 2 à 3 % par rapport aux 100 % du sol témoin. Ces différences expliqueraient en partie l'envahissement progressif du *Leucopaxillus* dans la prairie. On sait, en effet, que les racines des végétaux supérieurs excrètent des sucres et des acides aminés en fortes quantités, spécialement au printemps et lors des fortes luminosités (Vancura & Kunc, 1988). Le *Leucopaxillus* profiterait de ces excrétions radicellaires pour avancer dans la prairie. Sullia (1973) a montré que des extraits racinaires stimulaient fortement la croissance des moisissures rhizosphériques.

	Novembre	Juin
T	20	86
Lg	3,6	24
T + 4 mg de glucose	30	161
Lg + 4 mg de glucose	36	108
T + 4 mg de sucres réducteurs*	-	121
Lg + 4 mg de sucres réducteurs*	-	66

* sucres réducteurs issus des exudats de racines de prairie

Tableau 4 — Absorption de l'oxygène en µl d'O_2/g de terre/heure dans les anneaux de *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et dans le témoin (T) en 1973 et 1974.

	Novembre 1972	Novembre 1973	Février 1974	Mai 1974	Juin 1974
			Moisissures		
Lg	0,8	30	1	80	40
T	280	4300	350	290	1400
			Actinomycètes		
Lg	800	900	50	2900	2000
T	1100	3300	2400	3200	29000
			Bactéries		
Lg	750	1000	1900	19000	16000
T	800	2600	625	7100	108000

Tableau 5 – Analyse microbiologique de la terre envahie par *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et de la terre témoin (T). Nombre de moisissures, d'actinomycètes et de bactéries en milliers/g de terre, en 1972, 1973 et 1974.

Analyse microbiologique de la terre des anneaux

Nous avons calculé le nombre de différents groupements de microbes du sol selon la méthode de Pochon et Tardieux (1962). Deux échantillons sont prélevés : l'un dans la zone dénudée à *Leucopaxillus*, l'autre dans la terre témoin externe où le Basidiomycète n'a jamais poussé (Tableau 5).

Les moisissures subissent le recul le plus net. Elles se trouvent en nombre très inférieur dans la zone à *Leucopaxillus* mais ne disparaissent jamais complètement. Il subsiste des *Trichoderma viride*, des *Mucor*, des *Fusarium* (*F. culmorum*) et d'autres espèces. D'amples variations de nombre dépendent de l'année du prélèvement et de la saison. Warcup (1951) et Couderchet (1967) ont constaté le même phénomène pour d'autres Basidiomycètes. Comment les moisissures sont-elles éliminées ? Certainement pas par une substance inhibitrice comme la clitocybine puisque Hollande (1949) la déclare inactive sur les moisissures mais de préférence, comme le pense Couderchet, par compétition nutritionnelle.

Le nombre d'Actinomycètes connaît de profondes fluctuations suivant les prélèvements. Ils sont légèrement inhibés, sauf une fois en février où la zone à *Leucopaxillus* n'en possède presque plus et en mai où les deux valeurs sont égales.

L'ensemble des bactéries hétérotrophes aérobies subit, en général, une faible baisse dans les anneaux, excepté deux fois, en février et en mai, quand il y a stimulation. Peut-être est-ce dû, en février, à la suppression de l'action antagoniste exercée par les Actinomycètes. Couderchet (1967) note également une inhibition, plutot indirecte, du *Lepista* sur la microflore bactérienne et, selon Melin *et al.* (1947), certaines espèces de *Marasmius* sont des producteurs actifs de substances antibactériennes.

Antagonisme du *Leucopaxillus giganteus in vitro* et *in vivo*

L'activité antibiotique de *Leucopaxillus giganteus* (s. n. *Clitocybe gigantea* variété *candida*) a été démontrée, dès 1945, par Hollande (1945, 1947) puis par Riviere *et al.* (1947). Ce champignon produit un antibiotique à large spectre puisqu'il inhibe et tue toutes les souches de bactéries Gram- et Gram+ ainsi que le bacille tuberculeux.

Souches testées	diamètre d'inhibition (mm)
Klebsiella pneumoniae	16 net
Escherichia coli 548	14 net
Bacillus mycoides T4	16 net
Micromonospora globosa	1ère lecture 25 net 2nde lecture 12 peu net
Actinomycète n°1	1ère lecture 23 net 2nde lecture 15 peu net
Actinomycète n°2	19 net
Actinomycète n°3	26 net
Actinomycète n°6	21 net
*Penicillium sp.*1	0
*Penicillium sp.*2	1 ou 0
Mucor sp.	2 ou 0
Trichoderma sp.	1

Tableau [redacted] — Activité antagoniste de *Leucopaxillus giganteus* sur diverses souches de bactéries, d'Actinomycètes ou de moisissures. Diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Nous avons prouvé à nouveau, avec une culture pure de *Leucopaxillus* provenant de spores, que ce champignon est antagoniste d'une grande variété de bactéries Gram+ et Gram — et de diverses souches d'Actinomycètes (tableau 6 et figure 3). La souche isolée de spores est beaucoup plus active que celle provenant d'un fragment du chapeau. Nous avons de même trouvé une action antagoniste avec du mycélium prélevé *in situ*, dans la terre de prairie. Le Basidiomycète semble très peu actif sur les moisissures, voire même sans effet : pour Hollande (1945), la clitocybine n'a aucune action sur elles. Avec plusieurs souches, nous avons observé une absence ou un très léger antagonisme.

La terre envahie par le mycélium du *Leucopaxillus* est exempte d'activité antagoniste. Selon la technique de Pink (1961), la terre a été séchée, broyée et placée dans de petits cylindres, en surface de la gélose. Nous avons élué avec des tampons de pH acides et alcalins : aucune activité antagoniste ne fut décelée autour des cylindres. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Rivière *et al.* (1947) : après absorption sur charbon, alumine ou différentes argiles, pas un procédé d'élution ne permet de récupérer la clitocybine ; cet échec tiendrait à une dénaturation de la protéine. On peut donc penser que, dans le sol *in situ*, seuls sont inhibés ou tués les bactéries ou les Actinomycètes qui se trouvent directement au contact du mycélium. A l'intérieur des grains de terre dépourvus de mycélium du Basidiomycète, une activité bactérienne normale est à prevoir.

Causes de la toxicité du Basidiomycète sur les phanérogames de la prairie.

Le *Leucopaxillus* fait partie du groupe des basidiomycètes qui détruisent les phanérogames des prairies (groupe 1) et nous nous sommes demandé quels facteurs léthaux pouvaient être en cause. Deux expériences ont été réalisées. Dans la première, nous avons mélangé en quantités égales des extraits de terre envahis par le *Leucopaxillus* avec du liquide de culture du cresson et mesuré la croissance de celui-ci après 8 jours. Nous n'avons constaté aucune inhibition des plantules qui ont un bel aspect et des racines normalement



Fig. 3 — Antagonisme exercé par le mycélium de *Leucopaxillus giganteus* sur la microflore du sol de prairie. Deux carrés de mycélium (en noir) ont été déposés sur une boîte de milieu gélosé, ensemencée par 0,1 ml d'une dilution 10^{-4} de sol de prairie. Autour des carrés de mycélium, on distingue nettement une zone de 3-4 cm de diamètre dépourvue de colonies microbiennes.

développées. Il n'y a donc pas de produits phytotoxiques dans ces extraits. Par contre, si on cultive le *Leucopaxillus* sur un milieu à base de peptone et que le liquide soit mélangé au milieu pour plantules, la croissance des racines de cresson est fortement inhibée (racines brunes, courtes ou inexistantes) et la hauteur des plantules réduite de moitié : des produits phytotoxiques sont alors présents dans le liquide de culture du *Leucopaxillus*. Il y aurait plusieurs causes à la mortalité des phanérogames : 1) une asphyxie des plantes (comme nous l'avons vu plus haut, le mycélium recouvre densément stolons et racines) ; 2) une

	profondeur (cm)	humidité (%)
Lg	0 - 2	15,4
	2 - 3	25,2
	7 - 10	23
T	0 - 2	24,5
	7 - 10	18,8

Tableau 7 -- Humidité (%) en fonction de la profondeur dans le sol à *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et le sol témoin (T).

dessiccation de la terre envahie par le mycélium, d'où un manque d'eau pour la plante. Nous avons fait une mesure d'humidité du sol, début juin (tableau 7). La surface de la terre envahie par le *Leucopaxillus* est desséchée par rapport à la terre témoin.

La dessiccation par la multiplication du mycélium a été rapportée par presque tous les auteurs. Edwards (1984) et Couderchet (1967) pensent que la mortalité des phanérogames vient en partie du manque d'eau. Des substances toxiques interviendraient aussi, comme le cyanure d'hydrogène excrété par le *Marasmius oreades* (Lebeau & Hawn, 1963 ; Smith, 1980). Nous n'avons pas pu en mettre en évidence dans la terre envahie par le mycélium de notre champignon. Par contre, ce dernier en dégage lorsqu'il est cultivé au laboratoire sur des milieux peptonés. Le *Leucopaxillus* excrète la clitocybine qui exerce une action nécrosante sur les tissus (Rivière *et al.*, 1947) ; or, les stolons et les racines des phanérogames sont recouverts directement par le mycélium du *Leucopaxillus* et, par conséquent, soumis à l'action nécrosante de la clitocybine. Reste l'ammoniaque, accumulé dans les anneaux. Maze (1925 *in* Molliard, 1925) indique que des teneurs de 10,5 mg d'azote ammoniacal / 100 mg de terre intoxiquent le maïs. Nos résultats sont bien supérieurs à ces données. Au mois de juin, nous avons dosé l'azote ammoniacal suivant la profondeur de l'échantillon (tableau 8). La teneur maximale en ammoniaque se situe dans la couche superficielle, là où se trouve la densité maximale de racines, de stolons et de mycélium. L'ammoniaque libéré par le *Leucopaxillus* expliquerait donc, à lui seul, l'action léthale du *Leucopaxillus* sur les phanérogames ; c'est aussi l'avis de Couderchet (1967). En résumé, plusieurs causes peuvent déterminer la mort des phanérogames : l'asphyxie, la dessiccation, la clitocybine, l'ammoniaque.

Développement du *Leucopaxillus giganteus* en laboratoire

Développement [redacted] milieu terre

Deux souches sont isolées : l'une à partir de spores, l'autre à partir d'un morceau de sporophore de *Leucopaxillus*. Les deux souches ont été cultivées sur gélose malt-peptone et entretenues sur ce milieu. A partir de cultures en boîtes, on prélève des morceaux de 1,5 cm de côté qui servent a inoculer les Erlenmeyers contenant de la terre ou des racines de plantes de la prairie. La terre subit trois traitements : stérilisation à l'autoclave, stérilisation et réinoculation avec une suspension-dilution de terre au 1/10, terre non traitée. La terre est incubée à 18° et à 4° C. Les morceaux de mycélium sont placés au centre de l'Erlenmeyer à la surface de la terre et les résultats de la croissance notés après 15 jours, 1, 2, 4 mois d'incubation. Le mycélium du *Leucopaxillus* se développe très bien sur la terre stérile. On obtient un développement maximal en un mois, à 18° C. A 4° C.

Profondeur (cm)	Lg	T
0 - 2	74	3,5
2 - 3	36	-
7 - 10	7	2,5

Tableau 8 — Quantité d'azote ammoniacal (mg/100g de terre) en fonction de la profondeur dans le sol à *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et le sol témoin (T).

la croissance se révèle beaucoup plus lente et n'atteint pas encore le développement maximal après 4 mois d'incubation. Sur racines stériles, la croissance est plus abondante. Par contre, sur terre ou racines non stériles ou sur terre stérile réinoculée, elle s'avère nulle à 18° C et faible ou très faible à 4° C (figures 4, 5). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'inoculum provient d'une culturesur terre à + 4° C. Nous avons fait varier les substrats et les conditions d'incubation en utilisant, par exemple, des blocs de pelouses incubés à l'air ou en sacs plastiques et à différentes températures mais les résultats étaient identiques. On peut donc conclure que le mycélium de *Leucopaxillus* subit, de la part de la microflore du sol, un fort antagonisme, lequel est atténué à basse température où le *Leucopaxillus* trouve une moindre résistance. Cela se confirme par le fait qu'à + 4° C, seule une faible proportion de moisissures, isolées du sol témoin, pousse correctement (4 souches sur 24) alors que le *Leucopaxillus* croît à cette température. Dans les tests d'antagonisme, il peut même chevaucher le mycélium de quelques moisissures avant même qu'elles puissent apparaître.

Gramss (1981) a lui aussi décrit cet antagonisme du sol vis-à-vis des Basidiomycètes. Sur 17 terres étudiées, 15 inhibent complètement le développement des mycéliums et dans les 2 terres non inhibitrices, les *Agaricus* refusent de se multiplier. Les autres Basidiomycètes croissent grâce à la présence de plantes cultivées bien déterminées. Selon Gramss (1985), l'inhibition de la croissance des Basidiomycètes serait dûe à des composés volatils provenant de la décomposition des végétaux supérieurs. Boyle (1995) a montré qu'il fallait éliminer les moisissures par du Bénomyl pour réussir l'introduction d'un Basidiomycète. D'après Kackley *et al.* (1989), le Bénomyl n'influence pas le développement des Basidiomycètes à rond de sorcière.

Développement sur milieux de culture semi-synthétiques et synthétiques

A partir du milieu de Zscheile (1951), nous avons composé un milieu simple (voir matériel et méthode) dans lequel nous avons estimé les meilleures sources d'azote et de carbone par pesée du mycélium (résultats non figurés).

Source d'azote : L'azote organique complexe (peptones) fournit la meilleure source d'azote. La bactopeptone (Difco) dont on ne connaît pas le procédé de fabrication est la meilleure peptone. Sur peptone de caséine, le milieu a tendance à brunir. D'autres sources d'azote peuvent servir comme le glutamate mais l'alanine, l'asparagine ou le chlorure d'ammonium constituent des sources d'azote médiocres.

Source de carbone : Le *Leucopaxillus* utilise une grande variété de glucides sur milieu peptone. Il croît sur : glucose, galactose, fructose, xylose, saccharose, maltose, lactose, cellobiose, mannitol, amidon pectine, CMC, inuline. La croissance, partiellement inhibée par le lactose, l'est fortement par l'arabinose bien que ces deux sucres soient utilisés. Le *Leucopaxillus* ne digère pas la cellulose, l'alcalilignine ni l'acide humique.

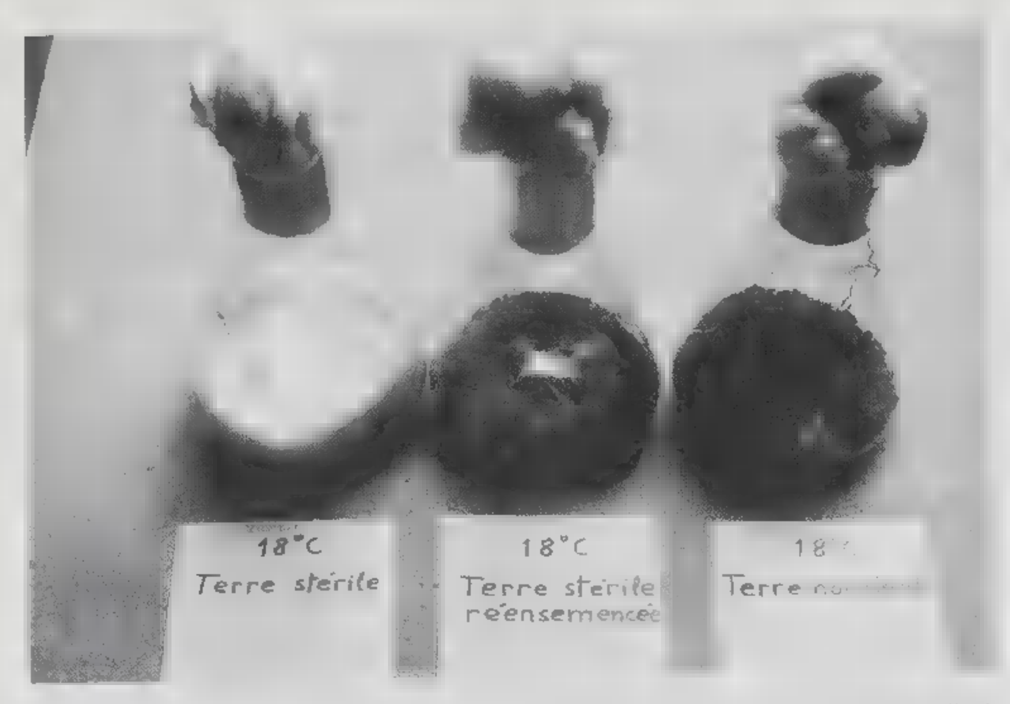


Fig. 4 — Croissance du mycélium de *Leucopaxillus giganteus* à 18° C sur la terre de prairie stérile (à gauche) et non stérile (à droite).



Fig. 5 — Croissance du mycélium de *Leucopaxillus giganteus* à 4° C sur la terre de prairie stérile (à gauche) et non stérile (à droite).

Mathur (1970) démontre que *Marasmius oreades*, en culture pure non agitée, assimile des fractions d'humus provenant de sources très différentes. La croissance est très stimulée (+ 50 %) par le bouillon de carottes ; Hollande (1945) avait déjà noté ce fait. En présence de glucides, les milieux sont acidifiés, excepté pour le saccharose, l'inuline, le mannitol, la CMC.

Leucopaxillus utilise le dextrane, un polyoside bactérien. Nous avons réussi le développement du *Leucopaxillus* à la surface de tapis bactériens incubés à basse température. Les bactéries, isolées de la rhizosphère du sol témoin, avaient été cultivées sur un milieu pauvre en azote organique ou avec de l'azote ammoniacal. Or, 80 % des bactéries de la rhizosphère sont capsulées et synthétisent des polyosides (Webley *et al.*, 1965). Par contre, le *Leucopaxillus* refuse de croître sur tapis de moisissure.

Une bonne croissance s'effectue sur milieu malt-peptone liquide ou gélosé. Elle est inhibée par l'azoture de sodium (0,1 g/l-1) et le bicarbonate de sodium (2 g/l).

Discussions et conclusions

La multiplication du mycélium de *Leucopaxillus giganteus* dans le sol d'une prairie est limitée dans le temps : de la fin de l'hiver jusqu'au début du printemps. L'avancement du mycélium en forme d'anneaux s'effectue irrégulièrement et la progression est d'autant plus forte que la saison est froide et humide. Sa multiplication va entraîner un certain nombre de modifications : mort des phanérogames, élimination des moisissures, hausse du pH par production d'ammoniaque, stimulation de plusieurs enzymes et accélération de la minéralisation du carbone et de l'azote organiques. Ces perturbations, communes à d'autres Basidiomycètes se développant en cercle dans les prairies, ont été décrites par plusieurs auteurs (Couderchet, 1967 ; Edwards, 1984). Les cultures de *Leucopaxillus* sur terre au laboratoire révèlent qu'en présence de la microflore naturelle du sol, le mycélium du Basidiomycète a beaucoup de mal à s'imposer et ne peut croître, de façon limitée, qu'à basse température. Ces observations *in vivo* et *in vitro* laissent penser que le *Leucopaxillus* profite d'un vide biologique pour dominer la microflore au repos. En effet, il se multiplie assez bien à basse température, ce qui n'est pas le cas de la majorité des moisissures et des bactéries de ce sol. En hiver, le *Leucopaxillus* supplanterait les moisissures avant même que ces dernières ne se développent. Boyle (1995) a montré qu'il fallait éliminer les moisissures pour réussir l'introduction d'un Basidiomycète. Mais intervient aussi le facteur nutritionnel : l'observation *in situ* nous montre un mycélium collé à la surface des stolons et des racines qui doit tirer parti des exsudats radicellaires et des polysaccharides bactériens, faits corroborés par les expériences *in vitro* : sa respiration est fortement stimulée par des extraits radicellaires sucrés et il peut croître à la surface de tapis bactériens. Pourrait-il s'imposer grâce à son antibiotique, la clitocybine ? Pas complètement, car celle-ci n'a de prise que sur les bactéries et les actinomycètes, non sur les moisissures. Pourtant, ce sont précisément ces dernières qui sont éliminées lors de l'avancement, les bactéries et les actinomycètes souffrant moins de [redacted] présence. Nous n'avons pas observé de mycélium reliant l'ancien cercle au nouveau ; sans doute la progression s'effectue-t-elle grâce aux spores. En conclusion, on ne sait pas encore exactement comment le Basidiomycète s'impose temporairement dans le sol de prairie mais on constate qu'il [redacted] besoin, pour ce faire, d'un vide biologique et d'un nutriment approprié.

BIBLIOGRAPHIE

BACHELIER G., 1973 — Activité biologique des sols et techniques simples qui en permettent l'évaluation. *Cahiers Orstom, série Pédologie* 1 : 65-77.

BECKER G., 1990 — *La vie privée des champignons.* Maloine SA ed. pp. 103-112.

BOYLE C. D., 1995 — Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organo-pollutants in soil. *Canadian journal of microbiology* 41 : 345-353.

COUDERCHET J., 1967 — Action du Basidiomycète *Rhodopaxillus saevus* (d'un rond de sorcière) sur la microflore tellurique. *Revue générale de botanique* 74 : 107-134.

DOMSCH K. H., BECK T., ANDERSON J. P., SÖDERSTRÖM B., PARKINSON D. & TROLL-DENIER G., 1979 — A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 42 : 520-533.

EDWARDS P. J., 1984 — The growth of fairy rings of *Agaricus arvensis* and their effect upon grassland vegetation and soil. *Journal of ecology* 72 : 505-513.

FENWICK H. S., 1976 — Fairy rings in lawns. *Publ. Agric. Exp. Stn. a related Inst* 325, 2 p.

FISHER R. F., 1977 — Nitrogen and phosphorus mobilization by the fairy ring fungus *Marasmius oreades* Bolt ex. Fr. *Soil biology and biochemistry* 9 : 239-241.

GRAMSS G., 1981 — New method for observation of soil-inhabiting fungal mycelia introduced into balanced plant-soil systems. *Zentralblatt für Bakteriologie. II Abteilung* 136 : 317-323.

GRAMSS G., 1985 — Approach to the nature of volatile compounds that dominate the ecological niche of Basidiomycetous ground fungi in the edaphosphere of grassland. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 140 : 597-606.

GRUNDA B. 1976 — Effects of fungal fairy rings on soil properties. *Ceska Mykologie* 30(1) : 27-32.

HOFFMAN G. G., 1967 — Photometric determination of phosphatase activity in soil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde* 118 : 161-172.

HOFFMAN G. G. & TEICHER K., 1961 — Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde* 95 : 55-63.

HOLLANDE M. A., 1945 — Lyse massive des bacilles de Koch chez le cobaye après traitement à la clitocybine. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 221 : 361-364.

HOLLANDE M. A., 1947 — La bactériostase et la bactériolyse du bacille tuberculeux par la clitocybine. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 224 : 1534-1537.

HOLLANDE M. A., 1949 — A propos de la clitocybine cristallisée. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 228 : 1758-1762.

KAISER P. & MONZON DE ASCONEGUI M. S., 1972 — Mesure de l'activité des enzymes pectinolytiques dans le sol. *Bulletin de biologie du sol* 14 : 16-19.

KAKLEY K. E., DEMOEDEN P. H. & GRAYBANKAS A. P., 1989 — Effect of fungicides on the occurence and growth in vitro of Basidiomycetes associated with superficial fairy rings in creeping bentgrass. *Plant disease* 73 : 127-130.

LEBEAU J. B. & HAWN E. J., 1963 — Formation of HCN by the mycelial stage of fairy ring fungus. *Phytopathology* 53 : 1395-1396.

MATHUR S. P., 1970 — Degradation of soil humus by the fairy ring mushroom. *Plant and soil* 33 : 717-720.

MELIN E., WIKEN T. & OBLOM K., 1947 — Antibiotic agents in the substrates from cultures of the genus *Marasmius. Nature (London)* 159 : 840-841.

MOLLIARD M., 1910 — De l'action du *Marasmius oreades* Fr. sur la végétation. *Bulletin de la société botanique de France* 57 : 62-70.

MOLLIARD M., 1925 — *Nutrition de la plante. IV Cycle de l'azote.* Doin ed., Paris. pp. 71-72.

NELSON N., 1944 — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of biological chemistry* 153 : 375-380.

NORSTADT F. A., FREY C. R. & SIGG H., 1973 — Soil urease : Paucity in the presence of the fairy ring fungus *Marasmius oreades* (Bolt) Fr. *Soil science society of America proceedings* 37 : 880-885.

PINK L. A., 1961 — Antibiotics in soils. II Extent and mechanism of release. *Soil science* 91 : 94-99.

POCHON J. & TARDIEUX P., 1962 — *Techniques d'analyses en microbiologie du sol.* La Tourelle ed. St. Mandé, France. pp. 29-42.

RIVIÈRE C., THÉLY M. & GAUTRON G., 1947a — Contribution à l'étude des principes antibiotiques extraits du *Clitocybe candida. Bulletin de la société de chimie biologique.* 29 : 857-863.

RIVIÈRE C., THÉLY M. & GAUTRON G., 1947b — Étude de la clitocybine, principe antibiotique extrait du *Clitocybe candida. Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 225 : 1386-1390.

SHANTZ H. L. & PIEMEISEL R. L., 1917 — Fungus firy rings in Eastern Colorado and their effect on vegetation. *Journal of agricultural research* 11 : 191-245.

SIMS R. J. & JACKSON G. D., 1971 — Rapid analysis of soil nitrate with chromotropic acid. *Proceedings, soil science society of America.* 3 : 603-606.

SMITH J. D., 1980 — Is biological control of *Marasmius oreades* fairy rings possible ? *Plant disease.* 64 : 348-355.

SOMOGYI M., 1945 — A new reagent for the determination of sugars. *Journal of biological chemistry* 160 : 61-68.

SULLIA S. B., 1973 — Effect of root exudates ans extracts on rhizosphere fungi. *Plant and soil* 39(1) : 197-200.

TOOHEY J. I., 1983 — Fungi fairy rings in soil : Etiology and chemical ecology. *Canadian field-naturalist* 97 : 9-15.

UMBREIT W. W., BURRIS R. H. & STAUFFER J. F., 1964 — *Manometric techniques.* 4th ed. Burgess Publish Compagny, Minneapolis. pp. 1-17.

VANCURA V. & KUNC F., 1988 — *Soil microbial associations.* Elsevier ed., New York. pp. 79-113.

WARCUP J. H., 1951 — Studies on the growth of Basidiomycetes in soil. *Annals of botany, London* 15 : 305-317.

WEBLEY D. M., DUFF R. B., BACON J. S. D. & FARMER V. C., 1965 — A study of polysaccharide-producing organisms occuring in the root region of certain pasture grasses. *Journal of soil science* 16 : 149-157.

ZSCHEILE F. P., 1951 — Nutrient studies with the wheat bunt fungus *Tilletia caries* (DC.) Tul. *Phytopathology* 41 : 1115-1124.